

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009887578

WPI Acc No: 1994-167493/199420

XRAM Acc No: C94-076827

Probe for detection of infectious disease - comprises DNA fragment specific for fungal disease agent, for diagnosis of e.g. Candida infection

Patent Assignee: FUSO PHARM IND LTD (FUSO); OHNO T (OHNO-I); FUSO YAKUHIN KOGYO KK (FUSO); ONO Y (ONOV-I)

Inventor: HIROTSU T; KESHI H; MATSUHISA A; OHNO T

Number of Countries: 023 Number of Patents: 010

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9410341	A1	19940511	WO 93JP1555	A	19931025	199420 B
JP 6133798	A	19940517	JP 92285802	A	19921023	199424
AU 9453445	A	19940524	WO 93JP1555	A	19931025	199434
			AU 9453445	A	19931025	
EP 670373	A1	19950906	EP 93923652	A	19931025	199540
			WO 93JP1555	A	19931025	
JP 2558420	B2	19961127	JP 92285802	A	19921023	199701
AU 680451	B	19970731	AU 9453445	A	19931025	199738
<u>US 5708159</u>	A	19980113	WO 93JP1555	A	19931025	199809
			US 95416831	A	19950619	
KR 159072	B1	19981116	KR 95701523	A	19950420	200030
TW 391985	A	20000601	TW 93108812	A	19931022	200060
CA 2147618	C	20010424	CA 2147618	A	19931025	200128
			WO 93JP1555	A	19931025	

Priority Applications (No Type Date): JP 92285802 A 19921023

Cited Patents: EP 335633; JP 2150300; JP 3206900; JP 4228080

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9410341 A1 J 36 C12Q-001/68

Designated States (National): AU CA KR US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

JP 6133798 A 12 C12Q-001/68

AU 9453445 A C12Q-001/68 Based on patent WO 9410341

EP 670373 A1 E 22 C12Q-001/68 Based on patent WO 9410341

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL SE

JP 2558420 B2 11 C12Q-001/68 Previous Publ. patent JP 6133798

AU 680451 B C12Q-001/68 Previous Publ. patent AU 9453445

Based on patent WO 9410341

US 5708159 A 16 C07H-021/04 Based on patent WO 9410341

KR 159072 B1 C12Q-001/68

TW 391985 A C12Q-001/68

CA 2147618 C E C12Q-001/68 Based on patent WO 9410341

Abstract (Basic): WO 9410341 A

A probe for diagnosing infections comprises a DNA fragment which hybridises to the fungus DNA. The DNA fragments are generated by an EcoRI digest of DMA from *Candida albicans*.

USE/ADVANTAGE - The probe is useful for diagnosis of fungal infection. Diagnosis time can be reduced from 3-4 days to 1-2, while maintaining accuracy.

In an example, genomic DNA was isolated from *Candida albicans* (C.A.-2b) using zymolyase and the Saito-Miura method of isolating by

phenol treatment. The DNA was completely digested by EcoRI and random cloned into the vector pGEM-3Z. The DNA fragment specific to *Candida albicans* was identified and called CA-2b.

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): US 5708159 A

A probe for diagnosing infections comprises a DNA fragment which hybridises to the fungus DNA. The DNA fragments are generated by an EcoRI digest of DMA from *Candida albicans*.

USE/ADVANTAGE - The probe is useful for diagnosis of fungal infection. Diagnosis time can be reduced from 3-4 days to 1-2, while maintaining accuracy.

In an example, genomic DNA was isolated from *Candida albicans* (C.A.-2b) using zymolyase and the Saito-Miura method of isolating by phenol treatment. The DNA was completely digested by EcoRI and random cloned into the vector pGEM-3Z. The DNA fragment specific to *Candida albicans* was identified and called CA-2b.

Dwg.0/5

Title Terms: PROBE; DETECT; INFECT; DISEASE; COMPRISE; DNA; FRAGMENT; SPECIFIC; FUNGUS; DISEASE; AGENT; DIAGNOSE; CANDIDA; INFECT

Derwent Class: B04; C07; D16

International Patent Class (Main): C07H-021/04; C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): C12N-015/09; C12N-015/11; C12Q-001/04; G01N-033/566; C12R-001-725

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E05; C04-E05; B04-F09; C04-F09; B11-C08E5; C11-C08E5; B12-K04A4; C12-K04A4; B12-K04F; C12-K04F; D05-H05; D05-H12D1

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M781 M903 N102 P831 Q233 V753

02 M423 M750 M903 N102 Q233 V500 V550

Chemical Fragment Codes (M6):

03 M903 P831 Q233 R515 R521 R627 R635

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-133798

(43)公開日 平成6年(1994)5月17日

(51)Int.Cl. ⁵ C 1 2 Q 1/68 1/04 // (C 1 2 Q 1/04 C 1 2 R 1:725)	識別記号 Z N A A 8931-4B	序内整理番号 7823-4B 6807-4B	F I	技術表示箇所 A
			C 1 2 N 15/00	
				審査請求 未請求 請求項の数5(全12頁)

(21)出願番号 特願平4-285802

(22)出願日 平成4年(1992)10月23日

(71)出願人 000238201
扶桑薬品工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号
(71)出願人 592147099
大野 典也
東京都港区北青山3丁目15番16号
(72)発明者 広津 韶夫
東京都渋谷区元代々木町30-8-304
(72)発明者 芥子 宏行
東京都北区東十条6-4-4 東十条スタ
ンザ102号
(74)代理人 弁理士 角田 嘉宏

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 感染症診断用プローブ

(57)【要約】

【目的】 真菌の検出および同定に有用な感染症起因菌由来のプローブを提供する。

【構成】 *Candida albicans* 菌が保有するDNAを抽出し、抽出したDNAをEcoRIで完全消化し、適当なベクターにクローニングして、それぞれの菌に特有のDNA断片を含むプローブを選抜する。さらに、選抜したプローブの塩基配列を解明する。

【効果】 真菌を特異的に検出し、迅速に同定できる。
解明された塩基配列は、PCR用プライマー作製のための指針として、また臨床検体に含まれるGenomiccDNAとの比較参考用に適した標準配列として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 真菌が保有するDNAと特異的に反応するDNA断片を含む感染症診断用プローブ。

【請求項2】 前記真菌が、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)菌である、請求項1に記載の感染症診断用プローブ。

【請求項3】 前記DNA断片が、カンジダ・アルビカ*

*ンス (*Candida albicans*) 菌が保有するDNAを、制限酵素 EcoRI および制限酵素AvaIを作用させて調製された切断片である、請求項2に記載の感染症診断用プローブ。

【請求項4】 前記DNA断片が、下記塩基配列(1)、(2)、および(3)の少なくとも一つの塩基配列を含む、請求項3に記載の感染症診断用プローブ。すなわち、

(1) GCGCAAGTCA TCAGCTTCGCG TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGTACACACC GCGCGTCGCT
ACTACCGATT GAATGGCTTA GTGAGGCCTC CGGATTGGTT TAGGAAAGGG GGCAACCTCA
TTCTGGAACC GAGAAGCTGG TCAAACCTGG TCATTTAGAG GAAGTAAAAG TCGTAACAAG
GTTTCCGTA

(2) GCTGGGTTTG GTGTTGAGCA ATACGACTTG CGTTTGCTTG AAAGACGGTA GTGGTAAGGC
GGGATCGTTT GACAATGGCT TAGGTCTAAC CAAAAACATT GCTTGCAGCG GTAACGTC
CCACCGTATACT CTTCAAACCT TGACCTCAAA TCAGCTAGGA CTACCCGCTG AACTTAAGCA
TATCAATAAG CGGAGGAAAAA GAAACCAACA GGGATTGCCT CAGT

(3) AACCGGATCT CTTGGTTCTC GCAGCGAAAT GCGATACGTA ATATGAATTG CAGATATTG
TGAATCATCG AATCTTGAA CGCACATTG GCCCTCTGGT ATTCCGGAGG GCATGCCGT
TTGAGCCTCG TTTCTCCCTC AAACCGCTGG GTTGGTGT GAGCAATACG ACTTGGTTT
GCTTGAAGA CGGTAGTGGT AAGGCGGGAT CGTTTGACAA TGGCTTAGGT CTAACCAAAA
ACATTGCTTG CGGCGGTAAC GTCCACCACG TATACTTCA AACTTGACC TCAAATCAGG
TAGGACTACC CGCTGAACCT AAGCATATCA ATAAGCGGAG GAAAAGAAC AACAGGGAT
TGCCCTCAGT

【請求項5】 前記DNA断片が、下記塩基配列を含む、請求項3に記載の感染症診断用プローブ。すなわち、

GAATTCCCTAG TAAGCGCAAG TCATCAGCTT GCGTTGATTA CGTCCCTGCC CTTTGACAC
ACCGCCCGTC GCTACTACCG ATTGAATGCC TTAGTGAGGC CTCCGGATTG GTTGGAA
GGGGGCAACC TCATTCTGGA ACCGAGAACG TGGTCAAAC TGGTCATTAA GAGGAAGTAA
AAAGTCGTAAC AAGGTTCCG TAGTGAACCT GCGGAAGGAT CATTACTGAT TTGCTTAATT
GCACCCACATG TGTGTTTCTT TGAACAACT TCCTTGCAGG TGGGCCAGC CTGCCGCCAG
AGGTCTAAAC TTACAACCAA TTTTTATCA ACTTGTCACA CCAGATTATT ACTTAATAGT
CAAACCTCAA CAAACGGATC TCTTGGTCT CGCAGCGAA TGCGATACT AATATGAATT
GCAGATATTG GTGAATCATC GAATCTTGA ACGCACATTG CGCCCTCTGG TATTCCGGAG
GGCATGCTG TTTGAGCGTC GTTCTCCCT CAAACCGCTG GGTTGGTGT TGAGCAATAC
GACTTGGTT TGCTTGAAAG ACGGTAGTGG TAAGGCGGAA TCGTTGACA ATGGCTTAGG
TCTAACCAAA AACATTGCTT CGGGCGGTAA CGTCCACAC GTATATCTC AACTTGTAC
CTCAAATCAG GTAGGACTAC CGGCTGAAC TAAAGCATATC AATAACCGGA GGAAAAGAAA
CCAACAGGGA TTGCGCTAGT AGCGCGAGT GAAGCGGCAA AAGCTCAAAT TTGAAATCTG
GGGTCTTGG CGTCCGAGTT GTAATTGAA GAAGGTATCT TTGGGCCGG CTCTGTCTA
TGTTCCTTGG AACAGGAGCT CACAGAGGGT GAGAATCCCC TGCGATGAGA TGACCCGGG

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、真菌感染症疾患起因菌の迅速な検出、同定、および診断に有用なプローブに関する。

【0002】

【従来の技術】 病理学的に、感染とは病原性の微生物(以下、「菌」と称する)が生体内に侵入し、増殖の足がかりを確立することを指し、生体内での菌の増殖に起因する発症は、宿主の抵抗力と菌の毒力との相互関係に依存するものである。

40 【0003】 感染症の中でも、真菌血症の治療方法、特に、小児癌患者の真菌感染症においては、通常の場合で数日、生体の抵抗力が弱まっている癌の末期段階では一日ないし二日間放置すれば死に至る、という重症かつ緊急な病気であるため、その治療方法の改善は急務とされている。

【0004】 感染症において、生体組織内では第一義的には好中球、単球及びマクロファージ系の食細胞がその防御に働いている。真菌血症での血液中の菌の出現とは、優勢になった菌が食細胞組織から血液中に侵出ししたものと考えられる。

【0005】菌血症（真菌血症を含む）は菌が血液中に侵出した状態であり、治療においては、起因菌に感受性のある抗生物質を大量に投与する。ところが、抗生物質は一般に肝臓など臓器の機能を低下させるため、有効でない抗生物質を危険な状態にある患者に投与することは極力避けなければならない。

【0006】一般に、細胞の食菌力が菌の毒力に及ばず、菌が全身の血流中に拡がる場合を菌血症（bacteremia）と定義すれば、菌の產生する毒素の働きで、重い症状を示す菌血症を敗血症（sepsis）と称する。そして、sepsisの証明、すなわち診断の確立には、①臨床症状、②検体の培養、③検体に含まれる菌のグラム染色、及び④ショック状態の確認が必須であり、これらの項目が確認されて初めて治療方針が決定される。したがって、臨床現場においては、迅速かつ確実な菌の同定が望まれているのである。

【0007】検査室での菌血症を疑われた検体の菌の検出・同定方法としては、カルチャー・ボトル法で陽性の検体に限って、選択培地を用いて同定が行われるのが一般的な手順である。しかしながら、実際にはこれら血液検体からの菌の培養の成功率は極めて低く、しかも、菌血症を疑われた時点で、大量に抗生物質を投与されている場合には、たとえ血液中に菌が含まれていても、増菌・増殖できない場合が多く、それ故、カルチャー・ボトル法で陽性になる割合は極めて少ない。

【0008】さらに、サブルーチンとしての方法に、菌体成分や菌の代謝産物の機器分析法（辨野義己、「ガスクロマトグラフィーによる細菌同定の迅速化」、臨床検査、vol. 29, No. 12, 1985年11月、医学書院参照）、特異抗体を利用した方法（日本特許出願公開昭60-224068号参照）、さらには、DNAの特異性を利用したハイブリダイゼーションによる方法（特許出願公表昭61-502376号）等があるが、いずれも、菌の分離及び増菌培養を必須とされている。

【0009】一方、感染症における食細胞の機能に着目したものとして、血液試料中の白血球成分が集中しているパフィーコート（Buffy coat）の塗抹染色標本を検鏡する方法がある。一般にパフィーコート標本で菌が検出される頻度は、成人菌血症では耳朶血の頻度と同様に30%程度にとどまるが、新生児の場合、10例中7例（70%）で菌を検出している報告もあり、塗抹標本の検鏡により末梢血中菌の有無に関する情報は治療における大きな指針となっている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術においては、その前処理操作として、少なくとも検体からの菌の選択的分離に1～2日、増菌に1日、固定操作に1日以上、合計で3～4日は十分かかり、現実にはこの培養を菌が発育するまで続けることになるので、カルチャー・ボトル法で陽性になった場合ですら、前処理操作に一週

間以上要する場合が多く、これがカルチャー・ボトル法で陽性を示した患者の死亡率を押し上げる要因になっている。例えば、「感染症学雑誌」、vol. 58, No. 2, p. 122, 1984年には、血液培養陽性率が28.6%（163/569件）でも、その内死亡率が84.6%（138/163件）にまで到っている旨が報告されている。

【0011】さらに、菌の培養時に疾患の原因菌以外の菌が混入しても区別できない場合もある。例えば、菌血症の起因菌の一つの表皮ブドウ球菌（Staphylococcus epidermidis）は、正常人の皮膚にも存在する菌であり、注射針を皮膚に刺す時にこの菌を取り込んで検体中に混入する虞もある。

【0012】そして重要なことは、前述した事情から、培養すべき検体中の多くの菌は食細胞に取り込まれ、抗生物質投与のため死んでいるか静止状態にあるため、培養条件下でも増殖できる菌の数は少なく、臨床検体を用いた培養による実際の菌の検出率は10%前後と、非常に低い。換言すれば、臨床的に菌血症が疑われた患者の血液をさらに一昼夜以上培養して検査しても結局、その90%は菌の存在すら判明しないのが現状である。

【0013】すなわち、菌血症においては、その感染症が、細菌あるいは真菌のいずれによるものか不明な場合が多く、また、その原因菌の種別により、抗生物質等の治疗方法も大きく異なる。このような状況から、現在は臨床的に真菌血症を疑った段階で、検出結果が出るのを待たずに治療、すなわち、最も広範囲な種類の菌に有效的な抗生物質を投与し、1、2日間様子を見て、効果が現れないと別の抗生物質に切換えるという試行錯誤的な方法に頼っているのである。

【0014】また、検体中の菌を染色により検出する方法では、生体成分も菌と同様に染色されるため、検鏡して認められる形態によってのみ迅速に菌を判別するのは、熟練が必要であり、判定が困難な場合もある。

【0015】このように、迅速・確実な診断が求められる疾患であるにもかかわらず、従来の診断方法では十分対応できていなかったのが実情である。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明は上記当該技術分野が抱えている課題に鑑みて完成されたものであり、その要旨とするところは、細菌由来ではなく、*Candida albicans*菌をはじめとする広範な真菌感染症起炎菌が保有するDNAまたはRNAと特異的な反応性を有するプローブであり、さらに、そのプローブが有するDNAの塩基配列を解明することにある。

【0017】また、これらのプローブの塩基配列情報を参照してプライマーをデザインすれば、ハイブリダイゼーションを行わなくとも、PCR法によるDNAの增幅により、感染症原因菌を同定することができる。

【0018】また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブを非放射性のもの、例えば、ビオチン化したプロ

ープを用いれば、放射性同位元素使用施設のない一般検査室でも検出でき、検出作業が迅速、簡便に行える。

【0019】以下に、*Candida albicans*菌由来するプローブの実施例を示す。

【0020】

【実施例】

実施例1：*Candida albicans*菌由来DNAプローブ

(1) *Candida albicans*菌由来DNAの選抜

臨床菌株*Candida albicans* (C.A.-26)を、サブロー培地で一晩培養し、培養菌体を集菌して、リゾチームの代わりにザイモリエイス(生化学工業)を加えた上で、Saito-Miura法("Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment", Biochem. Biophys. Acta vol. 72, pp. 619-629 (1963))に従って、Genomic DNAを抽出した。

【0021】抽出したDNAを、制限酵素EcoRIで完全消化し、ベクターpGEM-3Zにランダムクローニングし、得られたクローンから*Candida albicans*特有のDNA断片を選抜した。

【0022】そして選抜されたDNA断片をCA-26と命名し、その制限酵素地図を図1に示した。

【0023】(2) *Candida albicans*菌由来DNAプローブの種特異性の検定

上記実施例1(1)で選抜したDNA断片と各種感染症原因菌株が保有するDNAとの反応性を、以下の方法により検討した。

【0024】まず、検討対象菌株(全31種)の臨床菌株を準備した。

【0025】次に、各臨床菌株を実施例1(1)に記載の方法に従って、そのDNAを抽出し、この抽出したDNAの一定量($0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$)を、Byodyneナイロンフィルター

(type B)にスポットし、風乾し、0.5N NaOH-1.5M NaClで10分間アルカリ変性し、0.5M Tris-Cl(pH 7.5)-1.5M NaClで10分間中和し、1%SSCで5分間洗浄し、そして風乾したものを、ドット・プロット・ハイブリダイゼーションの試料とした。そして、DNA labeling and detection kit (Cat. No. 1175033: Boehringer Mannheim Biochemica)に従い、ジゴキシゲニン-dUTPでラベルした*Candida albicans*菌由来のDNAをプローブとして、マニアティスのマニュアル(Maniatis, et al., "Molecular Cloning (A Laboratory Manual)", Cold Spring Harbour Laboratory (1982))に従い、45%ホルムアミド、5×SSC、42℃の条件下で、2時間、前ハイブリダイゼーションした後、同じく42℃の条件下で、終夜ハイブリダイゼーションを実施した。

【0026】終夜ハイブリダイゼーションを終えた試料を、50℃にて1×SSC、0.1%SDSによる20分間の洗浄を2回行い、2%ブロッキング試薬(Skim milk:雪印)を30分間反応させ、約5mlの抗体結合体希釈溶液(150mU/ml(1:5000))でフィルターを、30分間、インキュベートし、50ml緩衝液(0.1M Tris-Cl(pH 7.5), 0.15M NaCl)で15分間の洗浄を2回行って抗体未結合体を除去し、10mlのA.P. 9.5で2分間、膜を平衡化し、プラスチック・パッケージで密閉したフィルターを、10mlのNBT/BCIP(BRL)でインキュベートし、検出・発色させ、そして、30mlのTE緩衝液で、10分間、膜を洗浄することによって反応を停止した。

【0027】本発明のプローブと各臨床菌株由来のDNAとのハイブリダイゼーション反応性に関する実験結果を、下記表1に示した。

【0028】

【表1】

7
細菌名

反応性

真菌名

反応性

8

<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Candida albicans</i> (40083)	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Candida albicans</i> (40084)	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Candida albicans</i> (40107)	++
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Candida albicans</i> (7N)	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i> (1623)	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i> (臨床分離株)	++
<i>Streptococcus sanguis</i>	-	<i>Candida krusei</i>	++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	<i>Candida tropicalis</i>	++
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	-	<i>Candida parapsilosis</i>	++
<i>Pseudomonas diminuta</i>	-	<i>Candida guilliermondii</i>	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	<i>Aspergillus fumigatus</i> (0063)	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	<i>Aspergillus flavus</i>	-
<i>Enterococcus agglomerans</i>	-	<i>Cryptococcus neoformans</i> (0354)	-
<i>Haemophilis parainfluenzae</i>	-	<i>Mucor spinosus</i> (1322)	-
<i>Haemophilis influenzae</i>	-		
<i>Haemophilis haemolyticus</i>	-		
<i>Haemophilis parahaemolyticus</i>	-		

++ : ハイブリダイズのシグナルを顕著に検出
 + : ハイブリダイズのシグナルを検出
 - : ハイブリダイズのシグナルは検出されず

【0029】上記表1から明らかなように、本発明のプローブは、多くの真菌類由来のDNAにのみ特異的に反応し、細菌由来のDNAとは交差しないことが判明し、その真菌特異性が確認された。

【0030】実施例2：塩基配列の解析

実施例1で真菌に対する特異性が確認されたDNAプローブの塩基配列を下記の方法に従って決定した。

【0031】(1) プラスミドDNAの調製

サブクローニングされた（塩基配列を決定すべき）挿入断片を pGem-3Z (Promega) に含んだ *Escherichia coli* K-12, JM109 形質転換体を、5ml の Luria-Bertani Medium (bacto-trypotone, 10g/l; bacto-yeast extract, 5g/l; NaCl, 10g/l; 5N NaOH で pH 7.0 に調整) に植菌し、一晩培養した。

【0032】培養液を遠心分離(5,000rpm, 5min.)して集菌した。沈殿物に2.5mg/ml の濃度でリゾチーム (Sigma) を含む 50mM グルコース/50mM Tris-HCl (pH8.0)/10 mM EDTA 溶液を 100μl 加え、室温で5分間放置した。

得られた懸濁液に1%の濃度でドデシル硫酸ナトリウム (Sigma) を含む 0.2M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて混合した。5M 酢酸カリウム水溶液 (pH4.8) 150μl をさらに加えて混合し、15分間氷冷した。

【0033】そして、遠心分離 (15,000rpm, 15min.) して得た上清を、フェノール/CHCl₃ 处理し、上清に2倍量のエタノールを加え、さらに遠心分離 (12,000rpm, 5min.) して沈殿を得た。この沈殿物を、10mM Tris-HCl (pH7.5)/0.1mM EDTA 溶液 100μl に溶解し、10mg/ml RNaseA (Sigma) 溶液を加え、室温で15分間放置した。

【0034】この調製物に 0.1M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH4.8) を 300μl 加え、フェノール/CHCl₃ 处理し、上

清にエタノールを加えて沈殿を得た。この沈殿物を乾燥し、10μl の蒸留水に溶解したものをDNA試料とした。

【0035】(2) 塩基配列決定の前処理

塩基配列決定の前処理を AutoRead (登録商標) Sequencing Kit (Pharmacia) を用いて行った。

【0036】すなわち、鉄型となるDNAが32μl 溶液中に5~10μg の濃度になるように調整した。1.5mlのミニチューブ (エッペンドルフ) に、鉄型DNA 32μl を移し、2M水酸化ナトリウム水溶液を8μl 加えて穂やかに混合した。そして、軽く遠心した後、室温で10分間放置した。

【0037】3M酢酸ナトリウム (pH4.8) 7μl と蒸留水 4μl を加え、さらにエタノールを 120μl 加えて混合し、ドライアイス上で15分間放置した。そして、15分間遠心分離して沈殿したDNAを集め、注意しながら上清を除去した。得られた沈殿物を70%エタノールで洗浄し、10分間遠心分離した。そして、注意しながら再度上清を除去し、減圧条件下で沈殿物を乾燥した。

【0038】沈殿物を蒸留水 10μl に溶解し、蛍光性のプライマー [Fluorescent Primer, M13 Universal Primer; 5'-Fluorescein-d CGACGTTGTAAAACGACGCCAGT -3' (1.6pmol/μl); 0.42 A₂₆₀ unit/μl]; M13 Reverse Primer, 5'-Fluorescein-d CAGGAAACAGCTATGAC -3' (2.1pmol/μl; 0.42 A₂₆₀ unit/μl)] 2μl (0.42 A₂₆₀ unit/μl, 4~6 pmol) とアニーリング用緩衝液 2μl を加え穂やかに混合した。

【0039】そして、軽く遠心した後、65°Cで5分間熱処理を行い、素早く37°C条件下に置き、そこで10分間保温した。保温後10分以上室温で放置し、軽く遠心し

た。そして、延長用緩衝液 $1\mu l$ とジメチルスルホキシド $3\mu l$ を加えたものを試料とした。

【0040】4本のミニチューブにA、C、GおよびTと記入し、それぞれのチューブにAMix (ddATPをdATP、dCTP、c' dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの)、C Mix (ddCTPをdATP、dCTP、c' dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの)、G Mix (ddGTPをdATP、dCTP、c' dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの)およびT Mix (ddTTPをdATP、dCTP、c' dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの)を $2.5\mu l$ ずつ分注した。なお、それぞれの溶液は使用時までは氷中で保存し、使用時には $37^\circ C$ で1分間以上保温してから使用した。

【0041】希釈したT7DNAポリメラーゼ (Pharmacia; 6~8 units/ $2\mu l$) $2\mu l$ をDNA試料に加え、ビベッティングもしくは穂やかな混合により、完全に混合した。

混合後すぐに、この混合液を $4.5\mu l$ ずつ保温しておいた4種の溶液に分注した。

【0042】なお、分注に際しては新しいチップを用いた。

【0043】 $37^\circ C$ で5分間保温し、停止溶液を $5\mu l$ ずつそれぞれの反応液に加えた。

【0044】この分注においても、新しいチップを用いた。 $90^\circ C$ で2~3分間保温し、すぐに氷中で冷却した。電気泳動には1レーンあたり $4\sim 6\mu l$ を泳動した。

【0045】(3) 塩基配列の決定

実施例1に開示したCandida albicansに対して特異性を有するプローブの、塩基配列の決定を、泳動温度 $45^\circ C$ 、泳動時間6時間として、A. L. F. DNA Sequencerシステム (Pharmacia)を用いて行った。その結果、カンジダ・アルビカンスCA-26の全塩基配列(配列番号1)が明らかとなった。

【0046】さらに、この全塩基配列の詳細を検討し、下記実施例3におけるプローブの基礎(Template DNA)となる、該全配列に含まれる3つの配列部位(配列番号2、3および4)を選択した。

【0047】

実施例3: PCR法によるTemplate DNAの増幅

(1) 試薬の混合

下記の試薬を、①~⑤の順に従って混合して、調製した。

【0048】① 10倍希釈緩衝液: $2\mu l$

② 0.5nM のdATP、dCTP、dGTP、およびdTTP: 各 $1\mu l$

③ オリゴヌクレオチド・プライマー No.14 (20mer:配列番号5): $2\mu l$

オリゴヌクレオチド・プライマー No.17 (20mer:配列番号6): $2\mu l$

④ Template DNA: $5\text{ ng}/2\mu l$

⑤ Taq polymerase (Cetus): $1.25\text{U}/0.25\mu l$

(2) Template DNAの増幅

上記調製済試薬およびDNA増幅機器(商品名「BiGene P HC-1」Techne社製)を用いて、Template DNAの増幅を行った。

【0049】なお、該増幅機器の温度コントロールは、熱変性を $94^\circ C\cdot 1$ 分間、プライマーのアニーリングを $62^\circ C\cdot 1$ 分間、および相補鎖の合成を $74^\circ C\cdot 1$ 分間に、それぞれ設定し、この反応サイクルを30回繰り返した。

【0050】(3) ハイブリダイゼーション法によるTemplate DNAと細菌DNAとの特異性の検定

① 配列番号2の塩基配列を有するTemplate DNAの増幅により得られた生成物 $10\mu l$ を、2%アガロース・ゲル (Seakern GTG Agarose) 上に置き、エチジウムプロマイド染色し、0.5N NaOH-1.5M NaClで30分間洗浄してアルカリ変性し、0.5M Tris-Cl (pH 7.5)-1.5M NaClで10分間中和し、Byodyne ナイロンフィルター(type B)に移して12時間置き、そして風乾したものを、サザーン・ハイブリダイゼーションの試料とした。そして、(図2および3のレーン番号と対応させて表示してある)下記表2に示した各種真菌類および細菌類のGenomicDNAに対して、45%ホルムアミド、 $5\times SSC$ 、 $42^\circ C$ の条件下で、2時間、前ハイブリダイゼーションした後、同じく $42^\circ C$ の条件下で、終夜ハイブリダイゼーションを行った。なお、プローブの3'末端には、20merのオリゴヌクレオチドを、DIG Oligonucleotide 3'-Endo Labeling Kit (Cat. No. 1362372: Boehringer Mannheim Biochemica)に従ってラベルしたものを用いた。

【0051】

【表2】

11

12

No.	真菌名	No.	細菌名
1	Candida albicans (40083)	16	Staphylococcus aureus (ATCC 25923)
2	Candida albicans (40084)	17	Staphylococcus epidermidis
3	Candida albicans (40107)	18	Escherichia coli (ATCC 25922)
4	Candida albicans (7N)	19	Klebsiella pneumoniae
5	Candida albicans (1623)	20	Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)
6	Candida albicans (臨床分離株)	21	Haemophilus influenzae
7	Candida guilliermondii		
8	Candida krusei		
9	Candida parapsilosis		
10	Candida tropicalis		
11	Cryptococcus neoformans (0354)		
12	Aspergillus flavus (0057)		
13	Aspergillus fumigatus (0063)		
14	Mucor spinosus (1322)		
15	Absidia corymbifera (2435)		

注：分子量マーカー（両端レーン）として、pBR328[BglII-HincII] ベーリンガーを、用いた。

【0052】終夜ハイブリダイゼーションを終えた試料を、50°Cにて1×SSC、0.1%SDSによる10分間の洗浄、および50°Cにて0.5×SSC、0.1%SDSによる10分間の洗浄を行い、風乾した後、-40°Cの条件下に終夜置いた。

【0053】図2に示した電気泳動図から明らかなように、配列番号2の塩基配列を有するTemplate DNAから調製したプローブの、真菌類が保有するGenomic DNAとの反応性が確認された。

【0054】② 同様に、配列番号3の塩基配列を有するTemplate DNAの増幅により得られた生成物10μlを用いて、上記①に記載の方法に従い、サザーン・ハイブリダイゼーションを行い、その結果を図3に示した。*

* 【0055】その結果、配列番号3の塩基配列を有するTemplate DNAから調製したプローブでは、細菌類には全く反応性を示さず、真菌由来のGenomic DNAに対してのみ反応性を示した。

【0056】③ 次に、配列番号4の塩基配列を有するTemplate DNAの増幅により得られた生成物10μlから、上記①に記載の方法に従い、サザーン・ハイブリダイゼーション用の試料を調製し、(図4のレーン番号と対応させて表示してある) 下記表3に示した各種真菌類および細菌類のGenomic DNAに対して、ハイブリダイゼーションを実施した。

【0057】

【表3】

No.	真菌名	No.	細菌名
1	Candida albicans (40083)	13	Staphylococcus aureus (ATCC 25923)
2	Candida albicans (40084)	14	Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228)
3	Candida albicans (40009)	15	Escherichia coli (ATCC 25922)
4	Candida guilliermondii (臨床分離株)	16	Klebsiella pneumoniae (臨床分離株)
5	Candida krusei (臨床分離株)	17	Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)
6	Candida parasilosis (臨床分離株)	18	Enterobacter agglomerans (臨床分離株)
7	Candida tropicalis (臨床分離株)	19	Streptococcus pneumoniae (HYSRH DP-2)
8	Cryptococcus neoformans (0354)	20	Streptococcus faecalis (ATCC 29212)
9	Aspergillus flavus (0057)	21	ヒト genomic DNA
10	Aspergillus fumigatus (0063)		
11	Mucor spinosus (1322)		
12	Absidia corymbifera (2435)		

注：分子量マーカー（両端レーン）として、φX174/HaeIII を、用いた。

【0058】その結果、配列番号4の塩基配列を有するTemplate DNAから調製したプローブにおいても、Candida属細菌由来のGenomic DNAに対する特異的反応性が確

認された(図4)。

【0059】④ 最後に、本発明のプローブの検出感度を50 ならびにヒトGenomic DNAに対する交差性に関して検定

を行った。

【0060】すなわち、配列番号2の塩基配列を有するTemplate DNAの増幅により得られた生成物10μlから、上記①に記載の方法に従い、ザザーン・ハイブリダイゼーション用の試料を調製し、(図5のレーン番号と対応させて表示してある)下記表4に示した各種濃度に調製*

No.	真菌名	No.	細菌名
1	Candida albicans (50ng)	12	Candida albicans (400pg)
2	Candida albicans (25ng)	13	ヒト genomic DNA 1
3	Candida albicans (10ng)	14	ヒト genomic DNA 2
4	Candida albicans (5ng)	15	ヒト genomic DNA 3
5	Candida albicans (1ng)	16	ヒト genomic DNA 4
6	Candida albicans (0.5ng)		
7	Candida albicans (0.1ng)		
8	Candida albicans (0.05ng)		
9	Candida albicans (0.01ng)		
10	Candida albicans (5pg)		
11	Candida albicans (1pg)		

注：分子量マーカー(両端レーン)として、pBR328[BglII-HincII]ベーリンガーを、用いた。

【0062】図5に示した結果より、本発明のプローブのプローブでは、5pg/μlという希薄な濃度でもCandida albicansのGenomic DNAを検出でき、さらに、ヒトGenomic DNAに対して交差性を有さないことが判明した。

【0063】

【発明の効果】本発明のプローブを用いれば、真菌を増殖することなく直接検出し、かつ菌を迅速にしかも正確に同定できる。すなわち、本発明のプローブを用いた診断では、1回分の検体で真菌の同定まで行え、診断に要する時間も従来法の3~4日(検出される率は低い)から、約1~2日と飛躍的に短縮でき、しかもその検出率は格段と高い。それ故、真菌血症の治療に対して画期的な指針を与えるばかりでなく、感染症患者に早期の内に有効な治療が実施でき、ひいては死亡率の低減も期待される。

【0064】また、真菌血症起炎菌の中でも、特に発症頻度の高い、Candida albicansに特異的に反応するプローブの塩基配列を明らかにしたことにより、これらプローブを人工的に調製することを可能とした。

【0065】さらに、臨床検体に含まれるGenomic DNAの塩基配列と本発明によって解析された塩基配列とを比較参考することにより、感染症原因菌種の迅速な同定が行える。

【0066】上記したように、本発明は、所期の目的であった、真菌に特異的な診断用プローブを提供するのみならず、PCR用プライマー作製の指針として、また臨床検体に含まれるGenomic DNAとの比較参考用に適した標

準配列として優れた有用性が期待され、さらには真菌血症起炎菌に特異的に反応するプローブの今後の探究・開発における貴重な手がかりをもたらす等の優れた効果を奏するものである。

【0067】また、本願出願にて開示した塩基配列は、臨床分離株のGenomic DNAをランダムにクローニングして得られたものであり、それ故、本発明の塩基配列の有用性はその相補鎖にまで及ぶものである。

【0068】さらに、野性株が保有するDNAに変異部分が存在することは当然考えられるが、上記実施例の開示から明らかなように、当該DNA変異部分が、Candida albicansが原因する感染症診断のためのハイブリダイゼーションへ利用する際の本発明プローブの特異性、あるいは本願出願にて開示した塩基配列情報を感染症の迅速診断を目的としたPCR法のプライマーをデザインするために利用できる等の、本発明が奏する有用性には何ら影響を与えるものではない。

【0069】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：899

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：カジダ アルビカンス (Candida albicans)

株名：臨床分離株 CA-26

配列

GAATTCTTAG TAACCGCAAG TCATCAGCTT GCGTTGATTA CGTCCCTGCC CTTTGACAC	60
ACCCGGCGTC GCTACTACCG ATTGAATGGC TTAGTGAGGC CTCCGGATTG GTTTAGGAAA	120
GGGGCAACC TCATTCTGGA ACCGAGAAGC TGGTCAAAC TGGTCATTAA GAGGAAGTAA	180

15

AAGTCGTAAC AAGGTTCCG TAGTGAACCT GCGGAAGGAT CATTACTGAT TTGCTTAATT
 GCACCATG TGTTTCTT TGAAACAACT TGCTTGCGG TGGGCCAGC CTGCCGCCAG
 AGGTCTAAC TTACAACCA TTTTTATCA ACTTGTACCA CCAGATTATT ACTTAATAGT
 CAAACTCAA CAAACGGATC TCTTGGTCT CGCAGCGAAA TGCGATACGT AATATGAATT
 GCAGATATTG GTGAATCATC GAATCTTGA ACCGCACATTG CGCCCTCTGG TATTCCGGAG
 GGCATGCGTG TTGAGCGTC GTTCTCCCT CAAACCGCTG GGTTGGTGT TGAGCAATAC
 GACTGGGTG TGCTTGAAG ACCTGAGTGG TAAGGCGGGA TGCTTGACA ATGGCTTAGG
 TCTAACAAA AACATTGCTT GCGGCGGAA CGTCCACCAC GTATATCTTC AAACTTGAC
 CTCAAATCAG GTAGGACTAC CGCCTGAAC TAAGCATATC AATAAGCGGA GGAAAAGAAA
 CCAACAGGGA TTGCCTCAGT AGCGCGAGT GAAGCGGAA AAGCTCAAAT TTGAAATCTG
 GCGCTCTTGG CGTCCGAGTT GTAAATTGAA GAAGGTATCT TTGGGCCGG CTCTTGTCTA
 TGTTCTTGG AACAGGACGT CACAGAGGGT GAGAATCCCG TGGATGAGA TGACCCGGG
 899

配列番号：2

配列の長さ：189

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

*配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：カンジダ アルビカンス (*Candida albicans*)

株名：臨床分離株 CA-26

*

配列

GCGCAAGTCA TCAGCTTGC TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGTACACACC GCCCGTCGCT
 ACTACCGATT GAATGGCTT GTGAGGCCTC CGGATTGGTT TAGGAAGGG GCGAACCTCA
 TTCTGGAACCC GAGAAGCTGG TCAAACCTGG TCATTTAGAG GAAGTAAAG TCGTAACAAG
 GTTCCCGTA 189

配列番号：3

配列の長さ：224

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

※配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：カンジダ アルビカンス (*Candida albicans*)

株名：臨床分離株 CA-26

※

配列

GCTGGGTTG GTGTTGAGCA ATACGACTT CGTTGCTTG AAAGACGGTA GTGGTAAGGC
 GGGATCGTTT GACAATGGCT TAGGTCTAAC CAAAAACATT GCTTGCCTCG GAAACGTCCA
 CCACGTATAT CTCAAACCTT TGACCTCAA TCAAGGTAGGA CTACCCGCTG AACTTAAGCA
 TATCAATAAG CGGAGGAAAA GAAACCAACA GGGATTGCCT CAGT 224

配列番号：4

配列の長さ：369

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

★配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：カンジダ アルビカンス (*Candida albicans*)

株名：臨床分離株 CA-26

★

配列

AAACGGATCT CTTGGTTCTC GCAGCGAAAT GCGATACGTA ATATGAATTG CAGATATTG
 TCAATCATCG AATCTTGAA CGCACATTGC GCCCTCTGGT ATTCCGGAGG GCATGCCCTGT
 TTGAGCGTCG TTCTCCCTC AAACCGCTGG GTTGGTGT GAGCAATACG ACTTGGGTTT
 CCTTGAAGA CGGTAGTGGT AAGGGGGAT CGTTTGACAA TGGCTTAGGT CTAACCAAAA
 ACATTGCTTG CGCGGTAAC GTCCACCACG TATATCTTCA AACTTGACC TCAAATCAGG
 TAGGACTTAC CGCTGAACCTT AAGCATATCA ATAAGCGGAG GAAAGAACAC AACAGGGAT
 TGCCCTCAGT 369

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：No

配列

(10)

特開平6-133798

17

18

GACAATGGCT TAGGTCTAAC

20

配列番号：6

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：20

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

アンチセンス：Yes

鎖の数：一本鎖

*

配列

TCATCTCATC GCACGGGATT

20

【図面の簡単な説明】

【図1】*Candida albicans* 菌検出用プローブの EcoRI断片の制限酵素地図である。

10

【図2】配列番号2の塩基配列を含むプローブと各種真菌ならびに細菌由来のGenomic DNAに対する反応性を示す電気泳動図である。

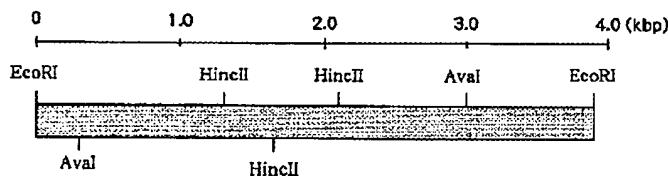
【図3】配列番号3の塩基配列を含むプローブと各種真菌ならびに細菌由来のGenomic DNAに対する反応性を示す電気泳動図である。

す電気泳動図である。

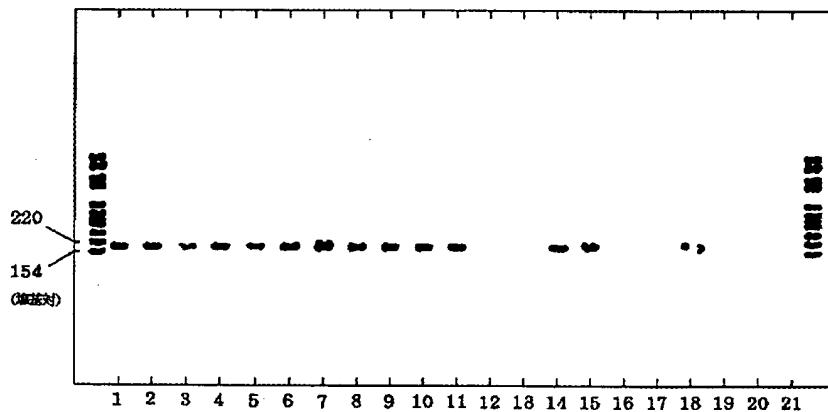
【図4】配列番号4の塩基配列を含むプローブと各種真菌ならびに細菌由来のGenomic DNAに対する反応性を示す電気泳動図である。

【図5】配列番号2の塩基配列を含むプローブと各種濃度の*Candida albicans* 菌ならびにヒト由来のGenomic DNAに対する反応性を示す電気泳動図である。

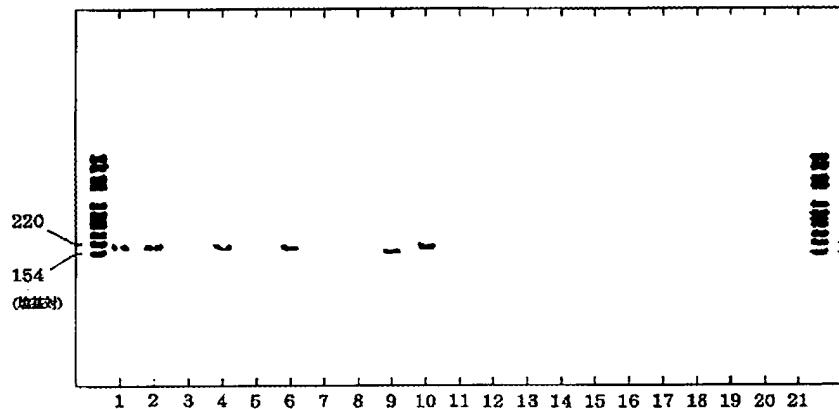
【図1】



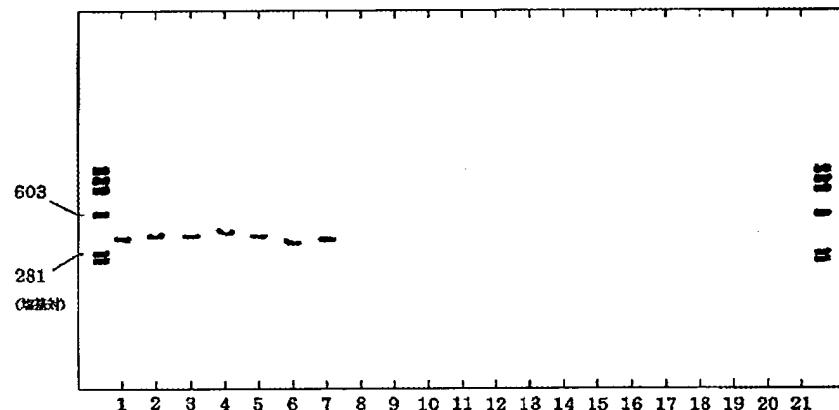
【図2】



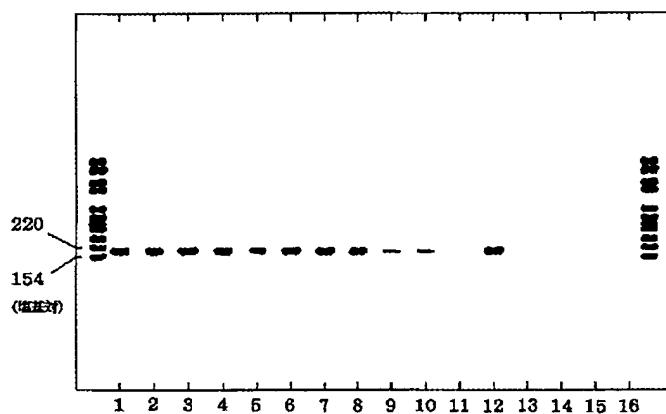
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 松久 明生
奈良県奈良市右京2丁目1-2の32-504

(72)発明者 大野 典也
東京都港区北青山3丁目15番16号